

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Lukáš Ryba

Mitochondriální pór přechodné propustnosti a jeho role v kardioprotekci
Mitochondrial permeability transition pore and its role in cardioprotection

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Martin Kalous, CSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 8. 2015

Podpis

Poděkování:

Chtěl bych upřímně poděkovat svému školiteli panu doc. RNDr. Martinovi Kalousovi, CSc. za jeho rady, čas a zejména za jeho trpělivost, které si vysoce cením. Dále děkuji panu RNDr. Zdeňku Drahotovi, CSc. za možnost na vlastní oči vidět bobtnání mitochondrií a za poskytnutí přínosných rad. V neposlední řadě děkuji i své rodině za poskytnutí příjemného zázemí.

Abstrakt

Mitochondriální pór přechodné propustnosti (MPTP) je nespecifickým napětově závislým kanálem, který se nachází ve vnitřní mitochondriální membráně. Otevření MPTP v důsledku zvýšení koncentrace Ca^{2+} a oxidativního stresu je považováno za hlavní událost vedoucí k buněčné smrti v tkáni postižené ischemií a následnou reperfuzí. Rozsah ischemicko-reperfusionního poškození (IRP) myokardu je důležitým faktorem ovlivňujícím mortalitu a morbiditu pacientů, jejichž myokard byl vystaven letálnímu období ischemie v průběhu akutního infarktu myokardu nebo kardiologického výkonu. Metody pro omezení závažnosti IRP jsou založeny na inhibici MPTP, a to prostřednictvím farmak nebo metod ischemické přípravy.

Tato práce se zabývá shrnutím současných poznatků o struktuře, regulaci a roli MPTP v kardioprotekci.

Klíčová slova: mitochondriální pór přechodné propustnosti, kardioprotekce, ischemická příprava, CsA, SAFE a RISK kaskáda

Abstract

The mitochondrial permeability transition pore (MPTP) is a non-specific voltage dependent channel which is located in the inner mitochondrial membrane. High calcium concentration and oxidative stress are main inducers of MPTP opening in a tissue which is affected by ischaemia and subsequent reperfusion. Morbidity and mortality of patients who suffer from acute myocardial infarction or cardiochirurgical operation, depends on the size of ischemic-reperfusion injury (IRI). The methods of IRI attenuation are based on the inhibition of the MPTP through pharmacological intervention or ischemic conditioning.

This thesis summarizes the current knowledge about the MPTP structure, regulation and its role in cardioprotection.

Key words: mitochondrial permeability transition pore, cardioprotection, ischemic conditioning, CsA, SAFE and RISK pathway

Seznam zkratek

ADP	Adenosin difosfát
AIM	Akutní infarkt myokardu
Akt	Protein kináza B
AMK	Aminokyseliny
ANT	Adenin nukleotidový translokátor
Apaf1	Aktivátor apoptotických proteáz 1
ATP	Adenosin trifosfát
Bad	Bcl-2 asociovaný protein podporující smrt buňky
Bak	Bcl-2 antagonist
Bax	Bcl-2 asociovaný X protein
Bcl-2	Protein lymfomu B-buněk
CDCU	Ca ²⁺ dependentní Ca ²⁺ uvolnění
cGMP	Cyklický guanosin monofosfát
CoA	Koenzym A
CsA	Cyklosporin A
CIRCUS	CYCLOsporinE A in Reperfused Acute Myocardial Infarction
CYCLE	Cyclosporine and Prognosis in Acute Myocardial Infarction Patients
CyP-D	Cyklophilin D
eNOS	Endoteliální NO syntáza
ERK1/2	Extracelulárním signálem regulovaná kináza 1/2
GPCR	G-protein asociované receptory
GSH	Glutathion
GSK-3β	Kináza glykogen syntázy-3β
G-6-P	Glukóza-6-fosfát
³H-DOG	³ H 2-deoxyglukóza
HK2	Hexokináza 2
IC	Ischemická příprava
IMM	Vnitřní mitochondriální membrána
IRP	Ischemicko reperfusní poškození
Jak	Janusova kináza
MPTP	Mitochondriální pór přechodné propustnosti
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ antiporter
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NHE-1	Na ⁺ /H ⁺ translokátor
MEK1/2	Mitogen aktivovaná protein kináza kinázy 1/2

MK	Mastné kyseliny
MitQ	Cílený mitochondriální antioxidant
OMM	Vnější mitochondriální membrána
OSCP	Olygomycin sensitivní část F ₀ F ₁ syntázy
PiC	Fosfátový přenašeč
PI3K	Fosfatidyl-inositol 3-kináza
PKC-ε1	Protein kináza C-ε1
PKG	Protein kináza G
PP	Přechodná propustnost
PostC	Post-ischemická příprava
PreC	Pre-ischemická příprava
RemC	Vzdálená ischemická příprava
RISK	Signální kaskáda reperfusního poškození
RP	Reperfusní poškození
ROS	Reaktivní kyslíkové radikály
SAFE	Přežití zajišťující signální kaskáda
SfA	SangliferinA
SLC25	Rodina mitochondriálních přenašečů
STAT3	Signální přenašeče a aktivátory transkripce
TNFα	Tumor necrosis factor α
TNFR	TNFα receptor
TO	Transientní otevření
TSA	Thiol-specifický antioxidant
VDAC	Napětově závislý aniontový kanál
Wt	Přirozený typ

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Struktura MPTP	2
2.1	F ₀ F ₁ -ATP syntáza jako základní součást MPTP.....	2
2.2	Adenin nukleotidový translokátor (ANT)	2
2.3	Fosfátový přenašeč (PiC).....	3
2.4	ATP syntasom.....	3
2.5	Napětově závislý aniontový kanál (VDAC)	4
2.6	Cyklophilin-D (CyP-D)	4
2.7	Proteiny Bcl-2 skupiny	5
3	Vlastnosti MPTP	6
3.1	Otevření MPTP	6
3.1.1	Přechodná propustnost (PP)	6
3.1.2	Vliv Ca ²⁺ a divalentních iontů na otevření MPTP	6
3.1.3	Vliv ROS na otevření MPTP.....	7
3.1.4	Vliv pH na otevření MPTP.....	8
3.1.5	Vliv Pi a polyfosfátů na otevření MPTP	8
3.1.6	Vliv adeninových nukleotidů na otevření MPTP.....	8
3.1.7	Vliv mastných kyselin na otevření MPTP.....	9
3.2	Fyziologická funkce MPTP – transientní otevření MPTP.....	9
4	Role MPTP v poškození myokardu	11
4.1	Průběh ischemie.....	11
4.2	Průběh reperfuse	12
4.3	Role MPTP v buněčné smrti.....	13
5	Kardioprotekce zprostředkovaná inhibicí MPTP.....	14
5.1	Ischemická příprava myokardu	14
5.1.1	RISK kaskáda	16

5.1.2	SAFE	17
5.2	Farmakologická inhibice MPTP	19
5.2.1	Cyklosporin A (CsA)	19
5.2.2	Sangliferin A (SfA)	19
5.2.3	ROS vzájemní inhibitory MPTP - Propofol, MitQ	19
5.3	Klinická aplikace metod inhibice MPTP.....	20
6	Závěr	21
	Seznam literatury.....	22

1 Úvod

Dle statistik WHO je možné pokládat kardiovaskulární choroby za jednu z hlavních příčin smrti ve vyspělém světě, kdy každý rok postihuje přibližně 17 milionů lidí. Z toho 7 milionů úmrtí je způsobeno ischemickými srdečními chorobami. Je tedy zřejmé, že se současný výzkum zaměřuje na snížení mortality a morbidit pacientů v důsledku ischemických chorob.

Pro omezení ischemického poškození je esenciální, co nejdříve provést reperfusi ischemické tkáně. Avšak výzkumy nasvědčují, že i přes nepochybně pozitivní účinky je reperfuse zároveň zodpovědná za další poškození myokardu. Všeobecně uznávaným faktorem zodpovědným za ischemicko - reperfusní poškození je MPTP, jehož otevření rozhoduje o přežití nebo smrti buňky nekrotickou či apoptotickou cestou. Ačkoli již v průběhu ischemie vzniká v buňce vhodné indukční prostředí pro otevření MPTP (zvýšená koncentrace Ca^{2+} , Pi, ROS, snížená koncentrace ADP apod.), k otevření MPTP dochází až v průběhu reperfuse. Otevření MPTP je provázeno přechodnou propustností (PP) IMM, která vede k zániku mitochondriálního membránového potenciálu, oxidativní fosforylace a je provázena bobtnáním mitochondrie. V konečném důsledku může dojít až k ruptuře vnější mitochondriální membrány (OMM).

Struktura a molekulární mechanismus otevření MPTP jsou i v současné době záhadou. Původní koncept struktury MPTP považoval za esenciální komponenty adenin nukleotidový translokátor (ANT), napěťově závislý aniontový kanál (VDAC), fosfátový přenašeč (PiC) a cyklophilin-D (CyP-D). Recentní pohled za esenciální komponentu považuje F_0 část ATP syntázy. ANT, VDAC, PiC a CyP-D jsou považovány za regulační komponenty, které určují citlivost MPTP k aktivačním či inhibičním podnětům.

V současné době je inhibice MPTP považována za důležitý terapeutický krok vedoucí k omezení poškození myokardu v důsledku reperfusního poškození. Ischemická příprava myokardu je vysoce efektivní metodou, která aktivuje protektivní signální dráhy a umožňuje tak snížit poškození tkáně až o 50%. Obecně je ischemická příprava vyvolána vystavením tkáně několika přechodným obdobím neletální ischemie.

V klinické praxi se postupně zavádí používání farmakologických inhibitorů MPTP. V tomto ohledu je nejvýznamnější cyklosporin A (CsA) - inhibitor CyP-D, který má prokazatelné kardioprotektivní účinky.

2 Struktura MPTP

2.1 F₀F₁-ATP syntáza jako základní součást MPTP

Současný model struktury MPTP předpokládá, že ústřední částí póru je F₀F₁-ATP syntáza (Alavian et al., 2014). ATP syntáza je vysoce konzervovaným multiproteinovým komplexem, který se nachází ve vnitřní mitochondriální membráně (IMM). Tento komplex poháněný elektrochemickým gradientem protonů (H⁺) je zodpovědný za syntézu ATP, univerzálního energetického platidla, z ADP a anorganického fosfátu. ATP syntázu je obecně možno rozdělit na oligomycin senzitivní část F₀, která je pohonnou částí celého komplexu a část F₁ zodpovídající za enzymatickou aktivitu ATP syntázy (Voet et al., 2004).

Struktura i část vlastností MPTP jsou dle výzkumů do značné míry závislé na F₀ části komplexu. Purifikované c podjednotky, které tvoří rotující prstenec F₀ části, po vložení do membrány liposomu spontánně vytváří pór, který se svou funkcí a vlastnostmi podobá MPTP *in vitro*. Buňky, ve kterých byla si-RNA interferencí down-regulována syntéza c-podjednotky ATP syntázy, vykazovaly vyšší rezistenci vůči vzniku MPTP (Bonora et al., 2013). Vzniklý napětově závislý pór vykazuje citlivost vůči koncentraci adeninových nukleotidů, avšak není regulovatelný např. CsA, CyP-D či hladinou Ca²⁺ (Alavian et al., 2014). Oblasti citlivé vůči CsA, CyP-D a Ca²⁺ jsou spjaté s dalšími proteiny tvořícími F₀ část ATP syntázy, zejména s proteinem OSCP, tvořícím laterální část statoru, který prokazatelně interaguje s CsA a CyP-D (Giorgio et al., 2009).

Pro tvorbu MPTP je důležitá schopnost ATP syntázy tvořit dimery, které rovněž mají značný význam ve formování mitochondriálních krist (Davies et al., 2012). U buněk bez schopnosti tvořit dimery (knock out v genech pro g- a e- podjednotky ATP syntázy) nebylo možné žádným způsobem indukovat otevření MPTP (Carraro et al., 2014). Tento jev byl potvrzen vložení purifikovaných dimerů ATP syntázy do liposomů, kdy oproti kontrolním liposomům s monomery ATP syntázy došlo k tvorbě funkčního MPTP (Giorgio et al., 2013).

2.2 Adenin nukleotidový translokátor (ANT)

Proteiny ANT 1,2, které společně s PiC náleží do široké rodiny mitochondriálních přenašečů SLC25, jsou vysoce abundantní proteiny vnitřní mitochondriální membrány (IMM), kde zastupují důležitou roli jako přenašeče adeninových nukleotidů nutných pro průběh oxidativní fosforylace (Palmieri, 2004). Během transportu ANT mění svou konformaci, kdy přechází mezi tzv. m- a c- konformačními stavy (mitochondriální/cytoplasmatický), které se liší specifitou vůči substrátu a k modulujícím sloučeninám. Do skupiny ANT modulujících látek

patří zejména bongkreková kyselina (inhibitor vzniku MPTP) blokující ANT v m-stavu a karboxyatractylosid stabilizující c-stav (stimulace vzniku MPTP). V návaznosti na zmíněné vlastnosti a schopnost interagovat s CyP-D byl ANT v minulosti považován za ústřední součást MPTP. K tomuto zároveň přispívá možnost modifikace thiolových skupin ANT během oxidativního stresu, která vede ke změně struktury ANT a specifity vůči ADP (McStay et al., 2002).

Zmíněná teorie však byla vyvrácena výzkumem na myších s knock-out geny pro syntézu ANT1 a ANT2. U hepatocytů modifikované populace myší nebyla ovlivněna schopnost indukce vzniku MPTP. Vzniklý pór však vykazuje rozdílné vlastnosti, a to zvýšení koncentrace Ca^{2+} nutné pro indukci vzniku póru a ztrátu citlivosti vůči kyselině bongkrekové, karboxyatractylosidu a adeninovým nukleotidům. ANT je tedy pro vnik MPTP důležitý pouze pro svou regulační a nikoli strukturní funkci (Kokoszka et al., 2011).

2.3 Fosfátový přenašeč (PiC)

PiC hraje důležitou úlohu v zajištění chodu syntézy ATP, kde se zejména uplatňuje při katalýze transportu organického fosfátu přes IMM, a to Pi/H^+ symportem nebo Pi/OH^- antiportem (Palmieri, 2004). Práce Leung et al. z roku 2008 pomocí imunoprecipitace poukázala na schopnost PiC interagovat s CyP-D (Leung et al., 2008). V návaznosti na tuto práci bylo při výzkumu *Saccharomyces cerevisiae* zjištěno, že PiC společně s ANT tvoří nespecifický kanál závislý na přítomnosti kardiolipinu, který se vlastnostmi podobá MPTP. Kardiolipin v tomto komplexu má zřejmě regulační úlohu, a to v modulaci citlivosti kanálu vůči Ca^{2+} (Pestana et al., 2009). Výzkum transgenních myší s navozenou vyšší či nižší expresí PiC, však neprokázal, že by PiC byl esenciální pro MPTP (Gutiérrez-Aguilar et al., 2014). V současné době se však předpokládá, že asociuje s F_0F_1 -ATP syntázou společně s ANT a má roli v regulaci MPTP na základě jeho senzitivity ke zvýšené koncentraci Pi (Ko et al., 2003).

2.4 ATP syntasom

Účast zmíněných přenašečů a F_0F_1 -ATP syntázy při tvorbě MPTP do značné míry koreluje se současným modelem savčího ATP syntasomu (viz Obrázek 1). Tento supramolekulární komplex v IMM umožňuje efektivní průběh závěrečného kroku syntézy ATP oxidativní fosforylací, kde usnadňuje průchod substrátů pro syntézu ATP až do blízkosti katalytického místa (Chen et al., 2004).

Struktura syntasomu a účast mitochondriálních komponentů na ní zatím není spolehlivě vyjasněna. Současný model, založený na výsledcích získaných výzkumem vesíklů

odvozených od mitochondriálních krist elektronovou mikroskopií či pomocí Blue Native gelové elektroforézy, je tvořen F_0F_1 -ATP syntázou, PiC a ANT (Ko et al., 2003). Interakce mezi jednotlivými komponenty je zprostředkována F_0 částí ATP syntázy, kdy toto uspořádání umožňuje vznik dimerů ATP syntázy (Chen et al., 2004).

2.5 Napětově závislý aniontový kanál (VDAC)

VDAC nacházející se v OMM je po strukturní stránce porinovým kanálem, jehož funkcí je umožnění průchodu metabolitů skrze membránu. Propustnost VDAC je závislá na membránovém potenciálu, kdy fluktuuje mezi plně otevřeným a plně zavřeným stavem. VDAC byl po dlouhou dobu pokládán za důležitou součást MPTP, a to na základě elektrofyziologických vlastností - tedy kinetiky propustnosti a možnosti jeho inhibice nízkým pH, které byly do jisté míry shodné s vlastnostmi MPTP (Szabó et al., 1993).

Podle dlouhou dobu uznávaného modelu byl pro tvorbu funkčního MPTP esenciální dimer VDAC interagující s dimerem ANT, CyP-D a proteiny z rodiny Bcl-2 proteinů. V roce 2007 však výzkumy s knock-out geny myších buněk pro VDAC-1, VDAC-2 a VDAC-3 nepotvrdily jeho esenciální roli pro tvorbu MPTP. V současné době se pouze uvažuje o jeho účasti na modulaci póru (Baines et al., 2007).

2.6 Cyklophilin-D (CyP-D)

CyP-D náleží do skupiny peptidyl-prolyl cis-trans isomeráz, které jsou důležitými enzymy pro skládání proteinových struktur (Fischer et al., 1989). CyP-D kódovaný genem *Ppif* je unikátní izoformou, která se nachází v mitochondriálním matrix a má výjimečnou úlohu při formování MPTP (Nicolli et al., 1996).

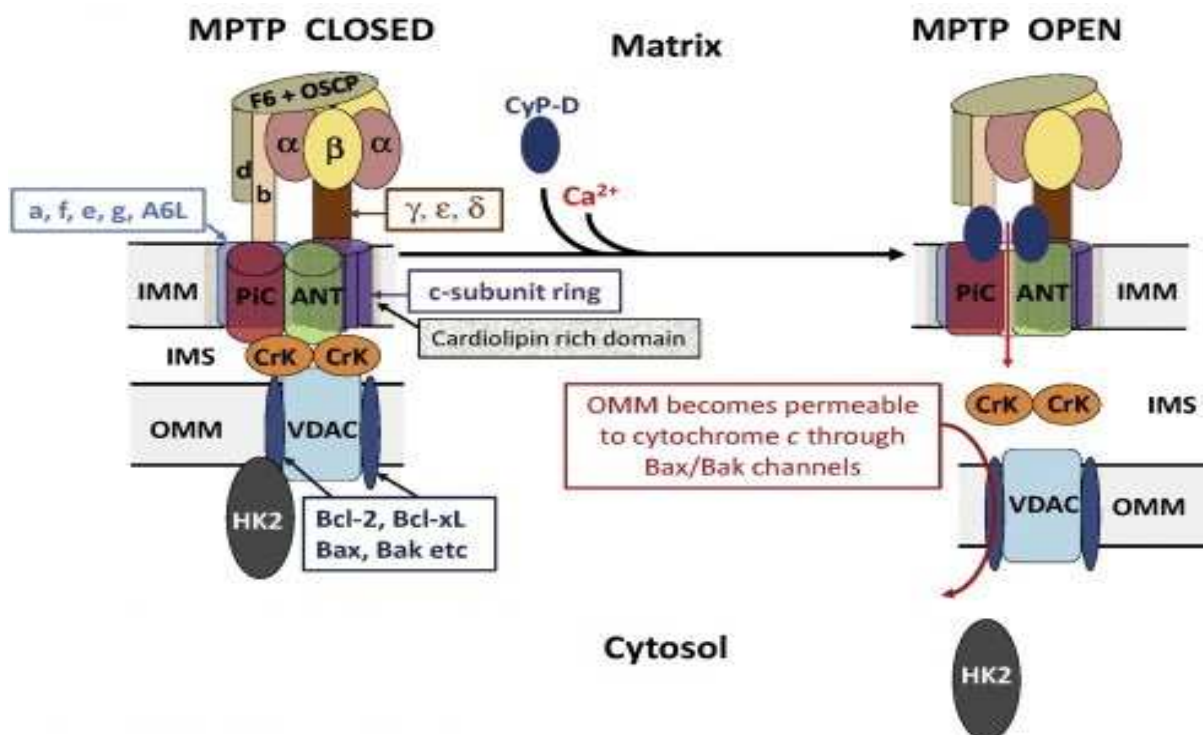
Pokusné organismy s knock-outovaným genem *Ppif* pro CyP-D vykazují vysokou odolnost vůči otevření MPTP v důsledku zvýšené koncentrace Ca^{2+} , Pi či ROS (Basso et al., 2005). Toho stavu lze dosáhnout farmakologicky použitím cyklosporinu A (CsA), který však inhibuje i další členy cyklophilinové skupiny proteinů. V současné době probíhají klinické testy, které se zabývají perspektivou farmakologické blokace CyP-D a snížením poškození tkání v důsledku ischemie (Piot et al., 2008).

Dle práce Lim et al. z roku 2007 je však inhibice CyP-D dvousečnou zbraní. Myši s knock-out genem *Ppif* jsou rezistentní k účinku pre-ischemické přípravy (PreC) a post-ischemické přípravy (PostC), což znemožňuje ochranu srdce prostřednictvím těchto dějů (Lim et al., 2007).

Způsob, jakým CyP-D interaguje s komponenty MPTP během jeho formování, je předmětem diskuzí. CyP-D prokazatelně interaguje s komplexem ANT a PiC (viz výše), kde dle studií hraje úlohu při oxidativní modifikaci thiolových skupin a při Ca^{2+} dependentní modifikaci ANT. Interakce mezi F_0F_1 -ATPázou a CyP-D je zprostředkována laterální částí statoru, tedy podjednotkami OSCP, b- a d-. Vazba CyP-D snižuje hydrolyzu ATP- F_0F_1 ATP syntázou a snižuje tak energetické ztráty (Giorgio et al., 2009).

2.7 Proteiny Bcl-2 rodiny

Bax/Bak, proteiny náležící do Bcl-2 rodiny jsou významné zejména svým proapoptotickým účinkem, který spočívá ve tvorbě nespecifických pórů ve vnější mitochondriální membráně. Po aktivaci a oligomeraci Bax/Bak vzniká nespecifický pór (Tait and Green, 2010), který umožňuje aktivaci apoptotické dráhy skrze uvolněný cytochrom c (Wei et al., 2001). Aktivita Bax/Bak je rovněž spjata s průběhem nekrotické smrti buňky po vzniku MPTP. Buňky myši s double knock-out geny pro Bax/Bak vykazovaly oproti Wt buňkám vysokou resistenci vůči mitochondriálnímu bobtnání vyvolanému vysokou koncentrací Ca^{2+} . V průběhu aktivity MPTP double knock-out mitochondrie vykazují rozsáhlou reorganizaci krist, avšak beze změn ve struktuře vnější mitochondriální membrány. Bax/Bak tedy při přechodné propustnosti (PP) fungují jako regulační komponenta vnější membrány, která umožňuje průběh PP, avšak proteiny nejsou integrální součástí MPTP (Karch et al., 2013).



Obrázek 1. Recentní model struktury MPTP. Převzato a upraveno z Halestrap et al., 2015.

3 Vlastnosti MPTP

3.1 Otevření MPTP

Otevření MPTP je událostí, která rozhoduje o buněčném životě a smrti. V současné době je rozeznáváno několik módů otevření MPTP. Starší z modelů předpokládá dva stavy otevření, které se liší maximální molární hmotností propouštěných solutů – tedy vysoce a nízce propustný stav (Haworth et al., 1979). Tento model však nebyl potvrzen a v dnešní době je uznáván pouze vysoce propustný stav, u kterého se rozlišuje permanentní otevření a transientní otevření. Tyto dva stavy se navzájem liší délkou otevření MPTP (Jacobson et al., 2002).

3.1.1 Přechodná propustnost (PP)

Přechodná propustnost je definována jako změna v propustnosti vnitřní mitochondriální membrány, která vede k neselektivnímu průchodu nízkomolekulárních solutů o molární hmotnosti do 1 400 Da. Tento jev je pozorován již více než 60 let na izolovaných mitochondriích vystavených vysokým koncentracím Ca^{2+} (Lehninger, 1962). Práce Huntera a Hawortha z roku 1979 vedla k současné době všeobecně uznávanému předpokladu, že je PP způsobena zejména vznikem a otevřením MPTP (Hunter et al., 1979).

Permanentní otevření MPTP je provázeno ztrátou membránového potenciálu, přerušením oxidativní fosforylace a vyrovnáváním osmotických tlaků mezi matrix mitochondrie a cytolem buňky. Toto vede k bobtnání mitochondrií, které se *in vitro* projevuje snížením absorpance při spektrofotometrii. Během bobtnání dochází k přestavbě mitochondriálních krist a v konečném důsledku k ruptuře OMM a vyplavení obsahu intermembránového prostoru do cytoplasmy, který zahrnuje proapoptotické signální molekuly (cytochrom c, Apaf1 a další) (Hunter et al., 1979).

3.1.2 Vliv Ca^{2+} a divalentních iontů na otevření MPTP

Vysoká koncentrace Ca^{2+} v buňkách je primárním aktivátorem MPTP (Hunter et al., 1979). Esenciální vliv Ca^{2+} na otevření MPTP je podpořen výzkumy s ionophorem Br-A23187 na potkaních hepatocytech (Qian et al., 1999). V případě, kdy je Ca^{2+} z matrix mitochondrie odstraněn chelatačními činidly (EGTA), dochází k uzavření póru a přerušování mitochondriálního bobtnání (Crompton et al., 1990). Vliv Ca^{2+} je dle současného názoru do značné míry modulován dalšími aktivátory či inhibitory MPTP. V případě, kdy dojde ke změně v jiném z regulačních parametrů, otevírá se MPTP i za fyziologické koncentrace Ca^{2+} .

Molekulární mechanismus aktivace MPTP prostřednictvím Ca^{2+} je předmětem diskuzí. Podle starších modelů Ca^{2+} aktivuje MPTP prostřednictvím vazby s molekulou kardiolipinu, který blízce souvisí se strukturou MPTP, a to zejména s ANT (Pestana et al., 2009). Současné pojetí MPTP, které předpokládá ústřední strukturní roli F_0F_1 -ATP syntázy, považuje za vazebné místo c-podjednotku ATP syntázy (Azarashvili et al., 2014). Zároveň se předpokládá, že regulace MPTP je dána dvěma vazebnými místy. Vazebné místo v matrix mitochondrie je specifické právě pro Ca^{2+} . V případě navázání jiných divalentních kationtů (Sr^{2+} , Mn^{2+} a zejména Mg^{2+}) dochází ke kompetitivní inhibici MPTP (Haworth et al., 1979). Výzkumy na potkaních mitochondriích odhalily přítomnost druhého vazebného místa, které směřuje do intermembránového prostoru a vykazuje opačnou aktivitu. V případě navázání Ca^{2+} dochází ke snížení pravděpodobnosti otevření MPTP (Bernardi et al., 1993).

Mg^{2+} je jedním z inhibitorů MPTP, který je účinný při koncentracích vyšších než 8mM. Mg^{2+} kromě kompetitivní vazby do vazebného místa MPTP je schopen inhibovat Ca^{2+} kanály L-typu a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter v plasmatické membráně, a tak zabraňovat zvýšení koncentrace Ca^{2+} během ischemie (Bernardi et al., 1992a).

3.1.3 Vliv ROS na otevření MPTP

ROS vznikající v průběhu reperfuse (více níže) jsou jedním z nejsilnějších aktivátorů MPTP. Během tohoto období dochází v mitochondriích ke značnému hromadění ROS, a to v důsledku reoxigenace elektronového transportního řetězce. Soudobé výzkumy za hlavní zdroj ROS považují intenzivní oxidaci sukcinátu nahromaděného v průběhu ischemie. Takto intenzivní oxidace vede ke vzniku reverzního toku elektronů na komplexu I a k produkci ROS. Důvodem akumulace sukcinátu je reverzní aktivita sukcinát dehydrogenázy, která je poháněna fumarátem, produktem degradace adeninových nukleotidů (Chouchani et al., 2014). Dalším zdrojem ROS je aktivita xantin-oxidázy, která během reperfuse oxiduje adeninové nukleotidy za vzniku hypoxantinu a O^- (McCord, 1985).

Vysoké hladiny ROS v matrix vedou k zahlcení mitochondriálního antioxidantního systému (GSH, TSA a NAD(P)H) a následně k oxidaci thiolových skupin proteinů IMM provázené tvorbou disulfidických můstků a agregací proteinů (Le Quoc et al., 1976). Pro aktivaci MPTP je zřejmě nejdůležitější oxidace dvou thiolových skupin ANT (Cys¹⁶⁰ a Cys²⁵⁷), jež vede ke změně struktury proteinu a jeho specifity k adeninovým nukleotidům (McStay et al., 2002). Oxidaci thiolových skupin vedoucí k otevření MPTP je možné zvrátit

přidáním thiol redukujících látek (dithiothreitol) nebo naopak posílit thiol oxidujícími látkami (diamid, fenylarsin oxid) (Lenartowicz et al., 1991; Siliprandi et al., 1974).

3.1.4 Vliv pH na otevření MPTP

Hodnota pH v matrix mitochondrie je důležitým faktorem určujícím otevření MPTP. K otevření MPTP dochází v de-energizovaných mitochondriích při pH 7,4. Při nižším pH dochází k reversibilní protonaci histidylových zbytků CyP-D, které vedou k uvolnění CyP-D a uzavření MPTP (Nicolli et al., 1993). Tento typ regulace MPTP je významný v průběhu ischemie a reperfuse (viz níže)

3.1.5 Vliv Pi a polyfosfátů na otevření MPTP

Role zvýšené koncentrace Pi v indukci otevření MPTP je spjatá se zvýšením citlivosti MPTP k Ca^{2+} . Mechanismus, jakým Pi zvyšuje pravděpodobnost otevření MPTP není zatím zcela objasněn. Práce A. Kowaltowski et al. představuje model, kdy v důsledku zvýšení koncentrace Pi v matrix mitochondrie dochází ke vzrůstu produkce ROS a otevření MPTP (Kowaltowski et al., 1996). Další možností je, že indukční efekt Pi je odvozen od pufrací kapacity v matrix mitochondrie a ve snižování koncentrace Mg^{2+} (Bernardi et al., 1992). Soudobé výzkumy na hovězích mitochondriích však poukazují na možnost, že vyšší koncentrace Pi zvyšuje pravděpodobnost vazby mezi CyP-D a komplexem MPTP. Nízká koncentrace Pi tedy zabraňuje CsA dependentní inhibici MPTP (Basso et al., 2008). Se schopností Pi aktivovat MPTP souvisí polyfosfáty. Polyfosfáty deponované v mitochondriích jsou dle studií na savčích kardiomyocytech prokazatelnými aktivátory MPTP (Seidlmayer et al., 2012).

3.1.6 Vliv adeninových nukleotidů na otevření MPTP

Haworth a Hunter jako první demonstrovali, že fyziologické hodnoty koncentrace adeninových nukleotidů snižují pravděpodobnost otevření MPTP. Z adeninových nukleotidů je ADP nejefektivnějším inhibítorem MPTP. Přidání ADP k bobtnajícím mitochondriím, vede k uzavření MPTP a tedy k zastavení bobtnání. Inhibice MPTP je dána vazbou ADP na ANT, která stabilizuje ANT v m-konformaci (Hunter et al., 1979). Tato hypotéza je potvrzena sníženou citlivostí MPTP vůči ADP v buňkách s vyřazeným genem pro ANT (Kokoszka et al., 2011).

3.1.7 Vliv mastných kyselin na otevření MPTP

Vlastnost neesterifikovaných MK s dlouhým řetězcem aktivovat MPTP a indukovat mitochondriální bobtnání je dle Skulacheva et al. dána jejich vysokou afinitou k ANT, který stabilizují v otevřené c-konformaci (Skulachev, 1991).

3.2 Fyziologická funkce MPTP – transientní otevření MPTP

Koncentrace kalciových kationtů v cytoplasmě je signálním prvkem, který má svou nezastupitelnou úlohu v životě a smrti buňky. Mitochondrie mají důležitou úlohu v udržování buněčné Ca^{2+} homeostázy, a to díky schopnosti uvolňovat a přijímat Ca^{2+} dle potřeby buňky. Za fyziologických okolností mitochondrie ovlivňují koncentraci Ca^{2+} během signalizace. Zároveň Ca^{2+} v mitochondriích moduluje metabolické procesy - Krebsův cyklus, katabolismus AMK, β -oxidaci apod. Během zvýšené aktivity kardiomyocytů se tento systém podílí na zvýšení produkce ATP pro zajištění energetické potřeby buňky (Chacon et al., 1996).

Úvahy o možné fyziologické funkci MPTP mají základ v práci Altschuld et al. z roku 1992. Výsledky této práce, jež se zabývala Ca^{2+} homeostázou po inhibici MPTP CsA, ukazují, že právě MPTP sehrává úlohu v homeostáze Ca^{2+} , a to prostřednictvím přechodného otevření (Altschuld et al., 1992).

Přesný mechanismus, jakým dochází k přechodnému otevření MPTP je v současné době předmětem diskuzí. Starší z modelů založený na výzkumu mitochondrií *in vitro* předpokládá možnost vzniku intermediálních stavů propustnosti, ve kterých je permeabilita MPTP nižší a umožňuje průchod pouze solutů o molekulární hmotnosti do 300 Da (Haworth et al., 1979). Druhý model přechodného otevření MPTP - transientní otevření, předpokládá pouze dva stavy otevření MPTP, a to stav plně uzavřený a plně otevřený. Transientní otevření (TO) MPTP se tedy od otevření permanentního liší svým časovým průběhem (Jacobson et al., 2002).

Předpokládaná funkce transientního otevření během dlouhodobého stresu nebo zvýšení koncentrace Ca^{2+} je spojena s uvolněním nahromaděného Ca^{2+} a snížením produkce ROS. Tento jev je označován jako Ca^{2+} dependentní Ca^{2+} uvolnění (CDCU). CDCU je do značné míry ovlivněné standardními aktivátory a inhibitory MPTP, zejména však hodnotou pH a produkcí ROS. CDCU se kromě udržení Ca^{2+} homeostázy podílí na Ca^{2+} signalizaci, kde MPTP v přechodném módu podporuje vznik mitochondriální depolarizace a generování Ca^{2+} signálních vln (Ichas et al., 1997).

Mechanismus uvolnění Ca^{2+} tedy umožňuje udržovat rovnováhu mezi aktivujícími a inhibujícími vlivy na MPTP a poskytuje možnost předcházet jeho permanentnímu otevření a smrti buňky. Díky tomuto je možné předpokládat, že transientní otevření je důležitým podkladem pro pre-ischemickou přípravu myokardu pro nadcházející období ischemie (PreC). V případě, že byl MPTP v průběhu PreC inhibován, dochází k minimalizování účinků PreC na přežívání buněk. (Hausenloy et al., 2004)

Propojení mezi transientním otevřením a PreC je dle Penna et al. dán dalším z mechanismů, a to ROS dependentním ROS uvolněním. ROS uvolněné do cytosolu během transientního otevření MPTP mají kardioprotektivní funkci, a to aktivací ROS dependentních protektivních signálních drah zahrnujících například kinázu PKC (Penna et al., 2006).

4 Role MPTP v poškození myokardu

Ischemicko-reperfusní poškození (IRP) myokardu je jevem, který je v dnešní době značně významným, a to pro jeho výskyt v důsledku akutních infarktů myokardu (AIM) či kardiochirurgických výkonů. Míra poškození tkáně v důsledku ischemie je závislá na velikosti postižené oblasti a na délce ischemie. Včasné provedení reperfuse ischemické tkáně je tedy esenciální pro snížení dopadu ischemie na postiženou oblast, a tedy pro zvýšení pravděpodobnosti přežití a uzdravení pacienta (Reimer et al., 1977). Jestliže je doba ischemie poměrně krátká, reperfuse umožňuje úplné obnovení funkce tkáně. V případě překročení kritické délky ischemie reperfuse paradoxně spouští kaskády, které vedou k dalšímu poškození myokardu, které může dosahovat až 50% původního poškození (Klein et al., 1989). Reperfusní poškození (RP) se projevuje hyperkontrakcí (Lambert et al., 1986), ochromením myokardu (Braunwald et al., 1982), mikrovaskulární obstrukcí (Kloner et al., 1974) a v konečném důsledku i nekrózou tkáně. Hlavním efektozem buněčné smrti v důsledku reperfuse je otevření MPTP, kdy jeho inhibice prokazatelně snižuje míru poškození tkáně v důsledku IRP (Crompton et al., 1988).

Koncept poškození tkáně v důsledku reperfuse je však neustále předmětem kontroverze. Odpůrci konceptu tvrdí, že RP je výsledkem pouze ischemického období, a to na základě nejednoznačnosti prokázání kauzality mezi buněčnou smrtí a reperfusí. Dále je poukazováno na výsledky výzkumu RP na jiných organismech, které jsou rovněž nejednoznačné (Kloner, 1993).

4.1 Průběh ischemie

Ischemie myokardu je stavem, vyvolaným nerovnováhou mezi zásobením tkáně kyslíkem a jeho potřebou. Z metabolického hlediska deficit v zásobení tkáně O_2 vede k dysfunkci mitochondrií, které již nedokážou nadále syntetizovat ATP a udržet stálý membránový potenciál. Pro zajištění energetických potřeb buňky dochází ke zvýšení aktivity fosfofruktokinázy a tedy ke zvýšení glykolýzy, které je provázeno hromaděním laktátu v tkáni (Halestrap et al., 1997).

Hromadění H^+ a pokles buněčného pH je hlavním faktorem vyvolávajícím vznik iontové dysbalance. Zvýšená koncentrace H^+ je kompenzována Na^+/H^+ antiportem zprostředkovaným NHE-1 transportérem (Lazdunski et al., 1985). V případě, že je NHE-1 inhibován prostřednictvím AVE-4890, dochází ke zmírnění následků IRP, a to na základě

zpomalení normalizace acidického pH v průběhu reperfuse a snižování hromadění Na^+ a Ca^{2+} v mitochondriích (Javadov et al., 2008).

Za fyziologických podmínek je Na^+ z buňky transportován Na^+/K^+ ATPázou. Během ischemie však glykolýza neposkytuje dostatečné množství energie na zajištění tohoto transportu. Vyrůstající koncentrace Na^+ má vliv na funkci $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporteru (NCX), který je za vysoké koncentrace Na^+ inhibován nebo pracuje v reversním modu. NCX tedy umožňuje buňce udržovat stálou koncentraci Na^+ v cytoplazmě, avšak na úkor zvýšení koncentrace Ca^{2+} (Schäfer et al., 2001). V průběhu ischemie dochází ke zvyšování koncentrace ADP a Pi. Zvýšená koncentrace ADP aktivuje degradační kaskádu vedoucí k rozložení adeninových nukleotidů na xantin a hypoxantin (McCord, 1985).

Již v průběhu ischemického období tedy dochází ke vzniku vhodného indukčního prostředí pro otevření MPTP, a to v důsledku vysoké koncentrace Ca^{2+} a Pi a snížení koncentrace ADP. Avšak Griffiths a Halestrap pomocí ^3H -DOG (^3H 2-deoxyglukóza) metody pozorovali, že otevření MPTP provází až období 2-3 minut od počátku reperfuse. Zmíněný jev je dán inhibičním efektem acidického pH, k jehož vymizení dochází v počáteční fázi reperfuse (Griffiths et al., 1995). Výzkumy však prokazují, že během ischemie dochází k regulovaným, krátkodobým otevřením MPTP, které umožňují mitochondrii regulovat koncentraci Ca^{2+} v matrix (viz výše).

4.2 Průběh reperfuse

Reperfuse myokardu je provázena obnovením dodávky O_2 a odplavením nahromaděných metabolitů z ischemické tkáně. Náhlý návrat k fyziologickému zásobení tkáně O_2 vede k obnovení aktivity mitochondrií, tedy k obnově membránového potenciálu a produkce ATP. Náhlá reoxygenace vysoce redukováného elektron transportního řetězce však v počátečních fázích reperfuse směřuje k vysoké produkci ROS. Významným zdrojem ROS je rovněž xantinoxidáza, která za přítomnosti kyslíku oxiduje nahromaděný xantin a hypoxantin vzniklých degradací adeninových nukleotidů (viz výše). Inhibice xantinoxidázy allopurinolem významně snižuje poškození tkáně IRP (DeWall et al., 1971).

Metabolické nároky post-ischemické srdeční tkáně jsou závislé na metabolismu mastných kyselin, kdy dochází k aktivaci β -oxidace, a to zejména v důsledku poklesu koncentrace inhibičního malonyl-CoA (Kudo et al., 1995). Intenzivní oxidace mastných kyselin je však

inhibiční pro pyruvát dehydrogenázu. Dochází tedy k hromadění pyruvátu vzniklého glykolýzou a jeho přeměně na laktát, který přispívá ke snižování buněčného pH (Lopaschuk et al., 1993). Podání inhibitoru malonyl-CoA dekarboxylázy, a tedy inhibice zvýšení metabolismu mastných kyselin, má kardioprotektivní účinky (Dyck et al., 2004).

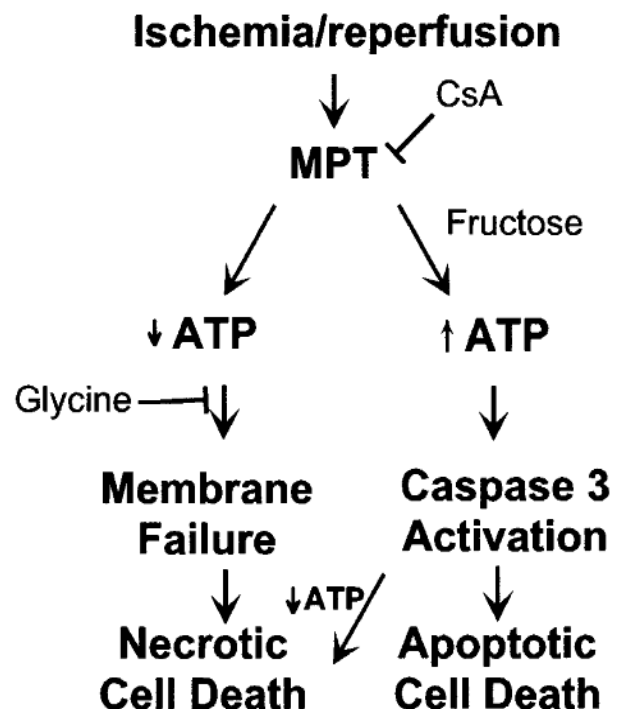
Společně s odplavením nahromaděného laktátu a H^+ se v průběhu reperfuse na normalizaci hodnoty pH podílí Na^+/HCO_3^- symport a Na^+/H^+ antiport. Rychlá normalizace pH umožněná těmito transportními mechanismy však přispívá ke zvýšení intracelulární koncentrace Na^+ a Ca^{2+} (Vandenberg et al, 1993).

Obnovení produkce ATP a membránového potenciálu umožňuje mitochondriím aktivovat transport Ca^{2+} z cytoplazmy do matrix, a to prostřednictvím ruthenium sensitivního Ca^{2+} uniporteru. Ačkoli se díky tomuto mechanismu koncentrace Ca^{2+} v cytoplasmě postupně přiblíží k fyziologickému stavu, mitochondrie jsou vysokou koncentrací Ca^{2+} přetíženy (Griffiths, 1998).

4.3 Role MPTP v buněčné smrti

Otevření MPTP v průběhu reperfuse je zpravidla provázeno aktivací kaskád vedoucích k nekrotické, či apoptotické buněčné smrti. Oba zmíněné procesy mají vzhledem k MPTP společný počátek, kdy v důsledku otevření MPTP dochází k vylití pro-apoptotických činitelů z mitochondriálního intermembránového prostoru do cytoplazmy buňky a zániku membránového potenciálu a s tím spjaté výrazné deplece ATP (více výše).

V určení dalšího průběhu buněčné smrti má výrazný podíl aktuální stav buňky, kdy hlavními určujícími faktory jsou koncentrace ATP a délka otevření MPTP. Důležitý náhled na tuto problematiku poskytla práce Kim et al. z roku 2003. Tato práce se zabývala buněčnou smrtí v důsledku otevření MPTP během reperfuse, kdy se jednotlivé tkáňové kultury potkaních



Obrázek 2. Schéma MPTP dependentní nekrotické a apoptotické smrti. Převzato z Kim et al., 2003.

kardiomyocytů lišily použitým substrátem. V kultuře, které bylo dodáno dostatek fruktózy a glycinu (který se podílí na stabilizaci membrán), podstoupilo vyšší procento buněk smrt apoptotickou než nekrotickou. Je tedy možné předpokládat, že při vyšší koncentraci ATP dochází k permanentnímu otevření MPTP pouze u frakce mitochondrií citlivé k indukci MPTP, a to v důsledku stáří či poškození mitochondrie. Zbylé mitochondrie jsou následně schopny pokrýt energetické nároky spjaté s průběhem apoptózy. V případě globální aktivace MPTP u většiny mitochondrií, nejsou zbylé mitochondrie schopny zajistit dostatek energie a buňka podstupuje smrt nekrotickou (viz obrázek 2) (Kim et al., 2003).

Současné výzkumy rovněž poukazují na účast MPTP nejen v buněčné smrti způsobené IRP, ale rovněž ve smrti indukované vnějšími aktivačními signály, a to například Fas-ligandem (Feldmann et al., 2000).

5 Kardioprotekce zprostředkovaná inhibicí MPTP

5.1 Ischemická příprava myokardu

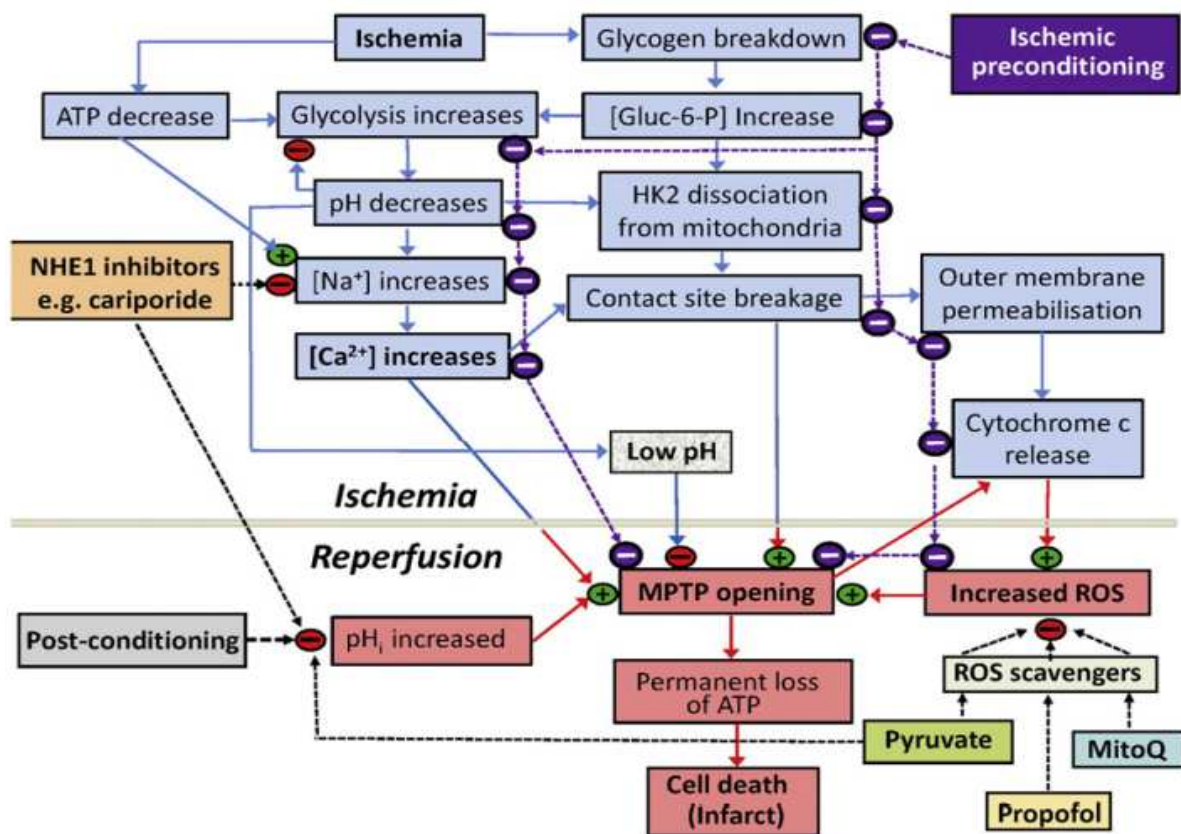
Ischemická příprava myokardu (IC) je souhrnem metod, které umožňují podstatně snížit poškození myokardu v důsledku IRP. Obecně tyto metody využívají aplikace krátkých neletálních období ischemie na „připravovanou“ tkáň, a to v období před začátkem, či po ukončení letálního období ischemie. Základním výzkumem, který vedl k rozvoji metod IC, byl výzkum Murry et al. z roku 1986. Práce zkoumala vliv krátkých neletálních ischemických období následovaných dlouhým obdobím ischemie na hladinu ATP v kardiomyocytech psího srdce. Předpřipravená srdeční tkáň (PreC) byla vystavena čtyřem cyklům pěti minutových neletálních ischemií, které byly přerušovány krátkými obdobími reperfuse. Oproti kontrolní skupině takto předpřipravená tkáň vykazovala vyšší schopnost odolávat ischemii. Poškození tkáně v důsledku vystavení tkáně letálnímu období ischemie bylo u PreC tkáně až o 75% nižší (Murry et al., 1986; Murry et al. 1986).

Metoda post-ischemické přípravy myokardu (PostC) je založena na poznatku, že je možné snížit poškození tkáně v důsledku IRP pomocí několika krátkých období ischemie aplikovaných v brzkém období reperfuse (Zhao et al., 2006). Podobně jako PreC i PostC aktivuje signální dráhy RISK a SAFE (viz níže).

Jev vzdálené pre-/post-ischemické přípravy (RemC) byl poprvé popsán ve studii Przyklenk et al. z roku 1993. Studie se zabývala vlivem čtyř epizod okluze *ramus circumflexus* levé koronární tepny na tkáň zásobovanou *ramus interventricularis anterior*,

kteřá byla vystavena 1 hodině ischemie. Pokusné subjekty, které prošly RemC, vykazovaly značnou odolnost vůči IRP (Przyklenk et al., 1993). Účinek RemC není limitován pouze na blízce lokalizované oblasti. V současné době bylo prokázáno interorgánové působení RemC, umožňující protekci myokardu pomocí přerušované okluze cévního zásobení v končetině, *mesenteriu*, ledvině nebo játrech (Gho et al., 1996; Kharbanda et al., 2002; Ateş et al., 2002)

Přesný molekulární mechanismus, kterým IC předchází poškození myokardu, není v dnešní době zcela objasněn. Práce Hausenloy et al. však jako první poukázala na možnost, že IC je spojeno s inhibicí otevření MPTP (Hausenloy et al. 2002). Zamezení otevření MPTP prostřednictvím IC je zprostředkováno signálními drahami RISK a SAFE, kdy inhibice těchto kaskád vede k vymizení kardioprotektivních účinků IC.



Obrázek 3. Schéma procesů aktivujících a inhibujících MPTP. Světle modré a červené boxy propojené plnými šipkami znázorňují události spjaté s ischemií a reperfuzí. Ostatní boxy, přerušované šipky a +/- znaménka ilustrují aktivitu inhibitorů MPTP. Převzato z Halestrap et al., 2015.

5.1.1 RISK kaskáda

RISK (Signální kaskáda reperfusního poškození) kaskáda je prokazatelně aktivována v počáteční fázi reperfuse, a to signálními molekulami vznikajícími v průběhu IC. Mezi známé aktivátory RISK kaskády patří adenosin, opioidy a bradykinin, kdy jejich účinek je zprostředkován vazbou se specifickými receptory asociovanými s G-proteiny (GPCR). Výzkumy potvrzují, že hlavními komponenty RISK kaskády aktivované prostřednictvím GPCR jsou kinázy PI3K-Akt (fosfatidyl inositol 3-kináza, protein kináza B) a ERK1/2 (extracelulárním signálem regulovaná kináza 1/2) (Zatta et al., 2008; Goto et al., 1995; Morrison et al., 2007).

Akt kináza je důležitou anti-apoptickou kinázou, která má významnou roli v buněčných procesech zahrnujících proliferaci a přežití buňky. V průběhu reperfuse GPCR aktivovaná fosfatidyl inositol 3-kináza fosforyluje a tedy aktivuje Akt kinázu (Bijur et al., 2003). V rámci RISK kaskády jsou hlavním cílem Akt kinázy: endotelová NO syntáza (eNOS), hexokináza 2 (HK2) a kináza glykogen syntázy-3 β (GSK-3 β).

eNOS prostřednictvím syntetizovaného NO aktivuje guanylát cyklázu. Zvýšená koncentrace cGMP je aktivační pro protein kinázu G (PKG). Dle práce Costa et al. fosforylovaná protein kináza G zprostředkovává předání signálu mitochondriální protein kináze C- ϵ (PKC- ϵ) (Garlid et al., 2004). Mechanismus přenosu signálu na PKC- ϵ skrze mitochondriální membránu v současné době není zcela vyjasněn (Costa et al., 2005).

Cílem PKC- ϵ se stává mitochondriální ATP sensitivní K⁺ kanál (mitK_{ATP}), který je jedním z hlavních efektorů RISK kaskády. Farmakologická aktivace mitK_{ATP} prostřednictvím diazoxidu prokazatelně inhibuje MPTP (Garlid et al., 1997). Mechanismus, kterým otevření mitK_{ATP} umožňuje inhibici MPTP je v současné době pouze ve fázi výzkumů. Jeden z modelů předpokládá esenciální roli K⁺ ve zvýšení produkce ROS prostřednictvím komplexu I, které mají v mitochondriích signální funkci a jsou zodpovědné za další aktivaci PKC- ϵ (Andrukhiv et al., 2006; Costa et al., 2006). PKC- ϵ je pokládán za konečný efektor RISK dráhy, který je zodpovědný za inhibici MPTP. Druhý model předpokládá úlohu mitK_{ATP} v udržování stálého objemu mitochondrií (Inoue et al., 1991).

Hexokináza 2 se za fyziologických podmínek váže prostřednictvím N-domény na vnější mitochondriální membránu. Tato vazba je závislá na koncentraci glukosa-6-fosfátu v cytoplasmě, kdy vysoká koncentrace G-6-P v cytoplasmě snižuje se afinitu HK2 k OMM. Ke zvýšení koncentrace G-6-P dochází v průběhu reperfuse, a to v důsledku katabolismu

glykogenu (Ardehali et al., 1999). Výzkumy prokazují přímou závislost mezi mírou disociace HK2 v průběhu IRP a poškozením tkáně (Pasdois et al., 2013). Fosforylace HK2 Akt kinázou zvyšuje afinitu HK2 k OMM (Miyamoto et al., 2008). Funkce HK2 v kardioprotekci prostřednictvím IC je dána několika mechanismy.

HK2 v asociaci s VDAC prokazatelně interaguje s proteiny Bcl-2 skupiny a zamezuje úniku cytochromu c do cytoplasmy a snižuje tak produkci ROS v průběhu IR (Pasdois et al., 2013). Zároveň se HK2 podílí na stabilizaci kontaktních míst mezi OMM a IMM, které jsou složeny z VDAC, ANT, HK2 a kreatin kinázy (CK) (Knoll et al., 1983). V průběhu IR dochází v důsledku disociace HK2 k destabilizaci těchto kontaktních míst a ke zvýšení citlivosti MPTP vůči Ca^{2+} a uvolnění cytochromu c do cytoplasmy (Pasdois et al., 2013).

Dle staršího pohledu role MEK1/2 aktivované ERK1/2 spočívá zejména v regulaci cytoplasmatických proteinů, a to GSK-3 β a Bcl-2 (Rahman et al., 2011). Nové výzkumy však prokazují, že ERK1/2 je lokalizována rovněž v mitochondriích, kde má přímý vliv na regulaci MPTP, a to prostřednictvím fosforylace pro-apoptotického proteinu Bad (Hernández-reséndiz et al., 2014).

Inaktivace GSK-3 β v důsledku fosforylace je zprostředkována ERK1/2 a Akt kinázami (Rahman et al., 2011). Práce Tong et al. z roku 2002 prokazuje, že inhibice GSK-3 β je kardioprotektivní (Tong et al., 2002). Avšak mechanismus interakce s MPTP je v současné době předmětem diskuzí. GSK-3 β má v aktivované formě vliv na fosforylaci VDAC1, která omezuje vazbu HK2 na OMM. Dále GSK-3 β interaguje s ANT, kde moduluje průchod adeninových nukleotidů (Das et al., 2008).

5.1.2 SAFE

Průběh SAFE (přežití zajišťující aktivace signálů) dráhy je nezávislý na aktivaci dráhy RISK. Primárním aktivátorem dráhy je TNF α (tumor necrosis factor α), pro-apoptotická signální molekula. Paradoxně odstranění TNF α prostřednictvím TNF α protilátek snížilo efektivitu IC. Tkáň, ve které byl TNF α vyvázan, vykazovala vyšší poškození myokardu (Yamashita et al., 2000) a stejné výsledky poskytly pokusy s pokusnými TNFR $\alpha^{-/-}$ potkany s knock-out genem pro receptor TNF α . Kardioprotektivní účinek TNF α se projevuje zejména při jeho nízké koncentraci (Lacerda et al., 2009).

Vazba TNF α s TNFR aktivuje asociovanou Janusovu kinázu (Jak). Následně dochází k dimerizaci a transfosforylaci těchto molekul. Vzniklý komplex fosforyluje cytoplasmatické

5.2 Farmakologická inhibice MPTP

5.2.1 Cyklosporin A (CsA)

Již od roku 1988 je imunosupresivní lék CsA využíváný pro schopnost účinně inhibovat kalcineurin, zároveň znám jako důležitý inhibitor MPTP. Význam CsA je dán jeho poměrně vysokou specifitou při inhibici MPTP. Inhibice MPTP spočívá v jeho interakci s CyP-D, která znemožňuje účast CyP-D na tvorbě MPTP. CsA zprostředkovaná inhibice vede ke snížení sensitivity MPTP k Ca^{2+} . Tento efekt však může být překonán dostatečným zvýšením koncentrace Ca^{2+} (J. Liu et al., 1991; Broekemeier et al., 1989).

5.2.2 Sangliferin A (SfA)

SfA je dalším zástupcem inhibitorů MPTP, který je obdobně jako CsA primárně využíváný pro své imunosupresivní účinky (inhibující CyP-A). SfA se na rozdíl od CsA váže do jiného vazebného místa, kde inhibuje isomerásovou aktivitu CyP-D. Inhibice SfA však může být obdobně jako u CsA překonána dostatečně silným podnětem. Z klinického hlediska je SfA využitelný pro léčbu IRP lépe než CsA, a to díky tomu, že není inhibitorem kalcineurinu (Clarke et al., 2002).

5.2.3 ROS vázající inhibitory MPTP - Propofol, MitoQ

Dle výzkumů využívajících Langendorffovou metodou perfundovaných kardiomyocytů, je hypnotikum propofol schopno inhibovat MPTP a chránit srdce proti IRP. Způsob, jakým propofol MPTP inhibuje je závislý na jeho koncentraci. Při klinicky využívaných koncentracích je protektivní funkce dána zejména schopností propofolu vázat ROS (Javadov et al., 2000). Při vyšších koncentracích je propofol schopen inhibovat MPTP přímo. Tento účinek je dán buď přímou interakcí s pórem nebo nepřímo díky vlivu propofolu na akumulaci Ca^{2+} (Sztark et al., 1995). Protektivní vlastnosti propofolu byly potvrzeny recentním výzkumem na prasečím modelu *in vivo*, kdy byl pokusným subjektům během uměle navozené ischemie průběžně propofol podáván. Pokusné subjekty oproti kontrolním vykazovaly znatelné snížení poškození myokardu (Lim et al., 2005).

MitoQ je farmakem, které v mitochondriální matrix vyvazuje ROS. Je prokázán kardioprotektivní účinek MitoQ na tkáň potkaních srdcí perfundovaných Langendorffovou metodou. Zároveň podání MitoQ výrazně snižuje pravděpodobnost post-ischemické srdeční hypertrofie (Adlam et al., 2005).

5.3 Klinická aplikace metod inhibice MPTP

Farmakologické inhibice MPTP a inhibice MPTP prostřednictvím IC jsou v současné době postupně přenášeny do klinické praxe, kdy i u lidských subjektů zmírňují poškození myokardu v důsledku akutního infarktu myokardu (AIM) či poškození myokardu v důsledku kardiochirurgických výkonů.

Farmakologická inhibice MPTP prostřednictvím CsA byla na lidských subjektech poprvé otestována skupinou Piot et al. v roce 2008. Pacienti, kterým byl před provedením reperfuse podán CsA, vykazovali až 40% snížení rozsahu poškození myokardu v období 72 hodin po podání CsA (Piot et al., 2008). V současné době probíhají dvě velké klinické studie zabývající se vlivem CsA na rozsah poškození v důsledku AIM. Cílem evropské studie nesoucí název CYCLE (CYCLOsporinE A in Reperfused Acute Myocardial Infarction) je ověřit CsA navozenou protekci u 444 pacientů, kterým byl podán CsA na začátku reperfuse (Latini et al., 2012). Druhá studie názvem CIRCUS (Cyclosporine and Prognosis in Acute Myocardial Infarction Patients) je v současné době ukončena a jsou vyhodnocovány výsledky. Tato studie zkoumá stav 972 pacientů v prvním a ve třetím roce po AIM (Ovize et al., 2011).

Využití PreC v léčbě následků AIM je provázeno obtížemi, a to z toho důvodu, že není možné předvídat nástup AIM. Klinicky zajímavým faktem je, že u pacientů trpících chronickou anginou pectoris, u kterých později došlo k rozvoji AIM, je poškození myokardu prokazatelně nižší než u pacientů, kteří *anginou pectoris* netrpěli (Rezkalla et al., 2004). PreC je však dobře využitelná při kardiochirurgických výkonech, kdy v tomto ohledu průkopnickou byla práce Yellon et al. z roku 1993 (Yellon et al., 1993).

Využitelnost metody PostC v klinické praxi byla v nedávné době hodnocena v práci Hu et al., která se zabývala meta-analýzou dostupných dat o léčbě pacientů pomocí metody PostC. Tato práce potvrdila význam PostC ve snížení pravděpodobnosti srdeční selhání (Hu et al., 2015).

Terapeutické využití inhibice MPTP v kardioprotekci je do značné míry limitováno zdravotním stavem pacienta. Výrazný vliv na snížení účinnosti kardioprotekce mají věk pacienta a přidružená onemocnění, kdy mezi nejvýznamnější patří *diabetes mellitus*, hyperlipidemie (Peart et al., 2014, Wu et al., 2014, Yadav et al., 2010).

6 Závěr

Tato práce z počátku shrnula současné i tradiční pojetí struktury a regulace MPTP. Model struktury MPTP v nedávné době prošel radikální proměnou, kdy tradiční komponenty (ANT, PiC a VDAC) již není možné považovat za esenciální součásti póru. Jejich strukturální úloha je nově přisouzena F_0 části ATP syntázy. S tímto souvisí i změna pojetí v molekulárních mechanismech regulace MPTP prostřednictvím Ca^{2+} , ROS, Pi, pH, které však zatím nejsou uspokojivě popsány.

Druhá část práce se zabývala shrnutím patofyziologické úlohy MPTP v procesech probíhajících během ischemicko reperfusního poškození. MPTP je prokazatelně hlavním efektoem kaskád vedoucích k IRP. Inhibice MPTP prostřednictvím ischemické přípravy a farmakologických inhibitorů se postupně stává součástí klinické praxe. V tomto ohledu nejvíce pokročila inhibice MPTP pomocí CsA, kdy klinické testování na pacientech trpících AIM již postoupilo do 3. fáze testů.

Bohužel zatím nejasné informace o struktuře a regulaci MPTP negativně ovlivňují výzkum klinického využití jeho inhibice v kardioprotekci. Avšak nové objevy v tomto poli předznamenávají příslib lepšího porozumění patofyziologické funkce MPTP. V budoucnu je tedy možné očekávat vývoj efektivnějších metod inhibice MPTP, které ještě více sníží dopady ischemických stavů na zdraví pacientů.

Seznam literatury

- Adlam, V. J., Harrison, J. C., Porteous, C. M., James, A. M., Smith, R. A. J., Murphy, M. P., & Sammut, I. A. (2005). Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(9), 1088–95. <http://doi.org/10.1096/fj.05-3718com>
- Alavian, K. N., Beutner, G., Lazrove, E., Sacchetti, S., Park, H.-A., Licznarski, P., ... Jonas, E. a. (2014). An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(29), 10580–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.1401591111>
- Altschuld, R. A., Hohl, C. M., Castillo, L. C., Garleb, A. A., Starling, R. C., & Brierley, G. P. (1992). Cyclosporin inhibits mitochondrial calcium efflux in isolated adult rat ventricular cardiomyocytes. *The American Journal of Physiology*, 262(6 Pt 2), H1699–704. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1377876>
- Andrukhiv, A., Costa, A. D., West, I. C., & Garlid, K. D. (2006). Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 291(5), H2067–74. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00272.2006>
- Ardehali, H., Printz, R. L., Whitesell, R. R., May, J. M., & Granner, D. K. (1999). Functional Interaction between the N- and C-terminal Halves of Human Hexokinase II. *Journal of Biological Chemistry*, 274(23), 15986–15989. <http://doi.org/10.1074/jbc.274.23.15986>
- Ateş, E., Genç, E., Erkasap, N., Erkasap, S., Akman, S., Firat, P., ... Kiper, H. (2002). Renal protection by brief liver ischemia in rats. *Transplantation*, 74(9), 1247–51. <http://doi.org/10.1097/01.TP.0000032752.61372.36>
- Azarashvili, T., Odinkova, I., Bakunts, A., Ternovsky, V., Krestinina, O., Tyynelä, J., & Saris, N.-E. L. (2014). Potential role of subunit c of F0F1-ATPase and subunit c of storage body in the mitochondrial permeability transition. Effect of the phosphorylation status of subunit c on pore opening. *Cell Calcium*, 55(2), 69–77. <http://doi.org/10.1016/j.ceca.2013.12.002>
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Sheiko, T., Craigen, W. J., & Molkenin, J. D. (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nature Cell Biology*, 9(5), 550–5. <http://doi.org/10.1038/ncb1575>
- Basso, E., Fante, L., Fowlkes, J., Petronilli, V., Forte, M. A., & Bernardi, P. (2005). Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(19), 18558–61. <http://doi.org/10.1074/jbc.C500089200>
- Basso, E., Petronilli, V., Forte, M. A., & Bernardi, P. (2008). Phosphate is essential for inhibition of the mitochondrial permeability transition pore by cyclosporin A and by cyclophilin D ablation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(39), 26307–11. <http://doi.org/10.1074/jbc.C800132200>
- Bernardi, P., Vassanelli, S., Veronese, P., Colonna, R., Szabó, I., & Zoratti, M. (1992a). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(5), 2934–9. Retrieved from http://www.researchgate.net/publication/21417538_Modulation_of_the_mitochondrial_permeability_transition_pore_Effect_of_protons_and_divalent_cations
- Bernardi, P., Vassanelli, S., Veronese, P., Colonna, R., Szabó, I., & Zoratti, M. (1992b). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(5), 2934–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1737749>

- Bernardi, P., Veronese, P., & Petronilli, V. (1993). Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate Me²⁺ binding sites with opposing effects on the pore open probability. *J. Biol. Chem.*, 268(2), 1005–1010. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/268/2/1005.abstract>
- Bijur, G. N., & Jope, R. S. (2003). Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Journal of Neurochemistry*, 87(6), 1427–1435. <http://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02113.x>
- Boengler, K., Buechert, A., Heinen, Y., Roeskes, C., Hilfiker-Kleiner, D., Heusch, G., & Schulz, R. (2008). Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice. *Circulation Research*, 102(1), 131–135. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.164699>
- Bonora, M., Bononi, A., De Marchi, E., Giorgi, C., Lebedzinska, M., Marchi, S., ... Pinton, P. (2013). Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell Cycle*, 12(4), 674–683. <http://doi.org/10.4161/cc.23599>
- Braunwald, E., & Kloner, R. A. (1982). The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*, 66(6), 1146–1149. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.66.6.1146>
- Broekemeier, K., Dempsey, M., & Pfeiffer, D. (1989). Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 264(14), 7826–7830. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/264/14/7826.short>
- Carraro, M., Giorgio, V., Sileikyte, J., Sartori, G., Forte, M., Lippe, G., ... Bernardi, P. (2014). Channel formation by yeast F-ATP synthase and the role of dimerization in the mitochondrial permeability transition. *Journal of Biological Chemistry*, 289(23), 15980–15985. <http://doi.org/10.1074/jbc.C114.559633>
- Clarke, S. J., McStay, G. P., & Halestrap, A. P. (2002). Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 34793–9. <http://doi.org/10.1074/jbc.M202191200>
- Costa, A. D. T., Garlid, K. D., West, I. C., Lincoln, T. M., Downey, J. M., Cohen, M. V., & Critz, S. D. (2005). Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circulation Research*, 97(4), 329–36. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000178451.08719.5b>
- Costa, A. D. T., Jakob, R., Costa, C. L., Andrukhiv, K., West, I. C., & Garlid, K. D. (2006). The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 20801–8. <http://doi.org/10.1074/jbc.M600959200>
- Crompton, M., & Costi, A. (1988). Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca²⁺, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca²⁺ overload. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 178(2), 489–501. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2850179>
- Crompton, M., & Costi, A. (1990). A heart mitochondrial Ca²⁺(+)-dependent pore of possible relevance to reperfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states. *The Biochemical Journal*, 266(1), 33–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1131092&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Das, S., Wong, R., Rajapakse, N., Murphy, E., & Steenbergen, C. (2008). Glycogen synthase kinase 3 inhibition slows mitochondrial adenine nucleotide transport and regulates voltage-dependent anion channel phosphorylation. *Circulation Research*, 103(9), 983–91. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.178970>

- Davies, K. M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gomez, J. D., & Kuhlbrandt, W. (2012). Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(34), 13602–13607. <http://doi.org/10.1073/pnas.1204593109>
- DeWall, R. A., Vasko, K. A., Stanley, E. L., & Kezdi, P. (1971). Responses of the ischemic myocardium to allopurinol. *American Heart Journal*, *82*(3), 362–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4935615>
- Dyck, J. R. B., Cheng, J.-F., Stanley, W. C., Barr, R., Chandler, M. P., Brown, S., ... Lopaschuk, G. D. (2004). Malonyl coenzyme a decarboxylase inhibition protects the ischemic heart by inhibiting fatty acid oxidation and stimulating glucose oxidation. *Circulation Research*, *94*(9), e78–84. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000129255.19569.8f>
- Feldmann, G., Haouzi, D., Moreau, A., Durand-Schneider, A. M., Bringuier, A., Berson, A., ... Pessayre, D. (2000). Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *31*(3), 674–83. <http://doi.org/10.1002/hep.510310318>
- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., & Schmid, F. X. (1989). Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature*, *337*(6206), 476–8. <http://doi.org/10.1038/337476a0>
- Garlid, K. D., Paucek, P., Yarov-Yarovoy, V., Murray, H. N., Darbenzio, R. B., D'Alonzo, A. J., ... Grover, G. J. (1997). Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circulation Research*, *81*(6), 1072–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9400389>
- Garlid KD, Costa AD, CohenMV, Downey JM, Critz SD. CyclicGMP and PKG activate mito K(ATP) channel in isolated mitochondria. *Cardiovasc J S Afr* 2004;15:S5
- Gho, B. C. G., Schoemaker, R. G., van den Doel, M. A., Duncker, D. J., & Verdouw, P. D. (1996). Myocardial Protection by Brief Ischemia in Noncardiac Tissue. *Circulation*, *94*(9), 2193–2200. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.94.9.2193>
- Giorgio, V., Bisetto, E., Soriano, M. E., Dabbeni-Sala, F., Basso, E., Petronilli, V., ... Lippe, G. (2009). Cyclophilin D modulates mitochondrial F0F1-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(49), 33982–33988. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.020115>
- Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., ... Bernardi, P. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(15), 5887–92. <http://doi.org/10.1073/pnas.1217823110>
- Goto, M., Liu, Y., Yang, X. M., Ardell, J. L., Cohen, M. V., & Downey, J. M. (1995). Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circulation Research*, *77*(3), 611–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7641331>
- Griffiths, E. (1998). Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, *39*(2), 423–433. [http://doi.org/10.1016/S0008-6363\(98\)00104-7](http://doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00104-7)
- Griffiths, E. J., & Halestrap, A. P. (1995). Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *The Biochemical Journal*, *307* (Pt 1), 93–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1136749&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Gutiérrez-Aguilar, M., Douglas, D. L., Gibson, A. K., Domeier, T. L., Molkentin, J. D., & Baines, C. P. (2014). Genetic manipulation of the cardiac mitochondrial phosphate carrier does not affect permeability transition. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *72*, 316–25. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.04.008>
- Halestrap, A. P., & Richardson, A. P. (2015). The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *78*, 129–41. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.08.018>
- Halestrap, A. P., Wang, X., Poole, R. C., Jackson, V. N., & Price, N. T. (1997). Lactate transport in heart in relation to myocardial ischemia. *American Journal of Cardiology*, *80*(3 A), 17–25. [http://doi.org/10.1016/S0002-9149\(97\)00454-2](http://doi.org/10.1016/S0002-9149(97)00454-2)
- Hattori, R., Maulik, N., Otani, H., Zhu, L., Cordis, G., Engelman, R. M., ... Das, D. K. (2001). Role of STAT3 in ischemic preconditioning. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *33*(11), 1929–36. <http://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1456>
- Hausenloy, D. J., Lecour, S., & Yellon, D. M. (2011). Reperfusion injury salvage kinase and survivor activating factor enhancement pro-survival signaling pathways in ischemic postconditioning: two sides of the same coin. *Antioxidants & Redox Signaling*, *14*(5), 893–907. <http://doi.org/10.1089/ars.2010.3360>
- Hausenloy, D., Maddock, H., Baxter, G., & Yellon, D. (2002). Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: A new paradigm in myocardial preconditioning?, *55*, 534–543. Retrieved from <http://discovery.ucl.ac.uk/90619/>
- Hausenloy, D., Wynne, A., Duchon, M., & Yellon, D. (2004). Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation*, *109*(14), 1714–7. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.0000126294.81407.7D>
- Haworth, R. A., & Hunter, D. R. (1979). The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *195*(2), 460–467. [http://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90372-2](http://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90372-2)
- Hernández-reséndiz, S., & Zazueta, C. (2014). PHO-ERK1 / 2 interaction with mitochondria regulates the permeability transition pore in cardioprotective signaling. *Life Sciences*, *108*(1), 13–21. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.04.037>
- Heusch, G., Musiolik, J., Gedik, N., & Skyschally, A. (2011). Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation Research*, *109*(11), 1302–8. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.255604>
- Hu, X., Cheng, J., Tang, B., Zhang, Z., Huang, K., Yang, Y., ... Fu, S. (2015). Clinical effect of postconditioning in ST-elevation myocardial infarction patients treated with primary percutaneous coronary intervention: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, *16*(3), 198–207. <http://doi.org/10.1631/jzus.B1400237>
- Hunter, D. R., & Haworth, R. A. (1979). The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *195*(2), 453–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/383019>
- Chacon, E., Lemasters, J. J., Ohata, H., Harper, I. S., Trollinger, D. R., & Herman, B. (1996). Mitochondrial free calcium transients during excitation-contraction coupling in rabbit cardiac myocytes. *FEBS Letters*, *382*(1-2), 31–36. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00138-X](http://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00138-X)
- Chen, C., Ko, Y., Delannoy, M., Ludtke, S. J., Chiu, W., & Pedersen, P. L. (2004). Mitochondrial ATP synthasome: three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(30), 31761–8. <http://doi.org/10.1074/jbc.M401353200>

- Chouchani, E. T., Pell, V. R., Gaude, E., Aksentijević, D., Sundier, S. Y., Robb, E. L., ... Murphy, M. P. (2014). Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*, *515*(7527), 431–5. <http://doi.org/10.1038/nature13909>
- Ichas, F., Jouaville, L. S., & Mazat, J. P. (1997). Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell*, *89*(7), 1145–1153. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80301-3](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80301-3)
- Inoue, I., Nagase, H., Kishi, K., & Higuti, T. (1991). ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature*, *352*(6332), 244–7. <http://doi.org/10.1038/352244a0>
- Jacobson, J., & Duchen, M. R. (2002). Mitochondrial oxidative stress and cell death in astrocytes--requirement for stored Ca²⁺ and sustained opening of the permeability transition pore. *Journal of Cell Science*, *115*(Pt 6), 1175–1188.
- Javadov, S. (2000). Protection of hearts from reperfusion injury by propofol is associated with inhibition of the mitochondrial permeability transition. *Cardiovascular Research*, *45*(2), 360–369. [http://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00365-X](http://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00365-X)
- Javadov, S., Choi, A., Rajapurohitam, V., Zeidan, A., Basnakian, A. G., & Karmazyn, M. (2008). NHE-1 inhibition-induced cardioprotection against ischaemia/reperfusion is associated with attenuation of the mitochondrial permeability transition. *Cardiovascular Research*, *77*(2), 416–24. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvm039>
- Karch, J., Kwong, J. Q., Burr, A. R., Sargent, M. A., Elrod, J. W., Peixoto, P. M., ... Molkenin, J. D. (2013). Bax and Bak function as the outer membrane component of the mitochondrial permeability pore in regulating necrotic cell death in mice. *eLife*, *2013*(2), 1–21. <http://doi.org/10.7554/eLife.00772.001>
- Kharbanda, R. K., Mortensen, U. M., White, P. A., Kristiansen, S. B., Schmidt, M. R., Hoschitzky, J. A., ... MacAllister, R. (2002). Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation*, *106*(23), 2881–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12460865>
- Kim, J.-S., Qian, T., & Lemasters, J. J. (2003). Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. *Gastroenterology*, *124*(2), 494–503. <http://doi.org/10.1053/gast.2003.50059>
- Klein, H. H., Pich, S., Lindert, S., Nebendahl, K., Warneke, G., & Kreuzer, H. (1989). Treatment of reperfusion injury with intracoronary calcium channel antagonists and reduced coronary free calcium concentration in regionally ischemic, reperfused porcine hearts. *Journal of the American College of Cardiology*, *13*(6), 1395–401. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2495317>
- Kloner, R. A. (1993). Does reperfusion injury exist in humans? *Journal of the American College of Cardiology*, *21*(2), 537–545. [http://doi.org/10.1016/0735-1097\(93\)90700-B](http://doi.org/10.1016/0735-1097(93)90700-B)
- Kloner, R. A., Ganote, C. E., & Jennings, R. B. (1974). The “no-reflow” phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *The Journal of Clinical Investigation*, *54*(6), 1496–508. <http://doi.org/10.1172/JCI107898>
- Knoll, G., & Brdiczka, D. (1983). Changes in freeze-fractured mitochondrial membranes correlated to their energetic state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *733*(1), 102–110. [http://doi.org/10.1016/0005-2736\(83\)90095-0](http://doi.org/10.1016/0005-2736(83)90095-0)
- Ko, Y. H., Delannoy, M., Hullihen, J., Chiu, W., & Pedersen, P. L. (2003). Mitochondrial ATP synthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for Pi and ADP/ATP. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(14), 12305–9. <http://doi.org/10.1074/jbc.C200703200>

- Kokoszka, J. E., Waymire, K. G., Levy, S. E., Sligh, J. E., Cai, J., Jones, D. P., ... Wallace, D. C. (2011). Permeability Transition Pore, *427*(6973), 461–465. <http://doi.org/10.1038/nature02229>.The
- Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F., Grijalba, M. T., Bechara, E. J. H., & Vercesi, A. E. (1996). Effect of Inorganic Phosphate Concentration on the Nature of Inner Mitochondrial Membrane Alterations Mediated by Ca Ions: A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(6), 2929–2934. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.6.2929>
- Kudo, N., Barr, A. J., Barr, R. L., Desai, S., & Lopaschuk, G. D. (1995). High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(29), 17513–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7615556>
- Lacerda, L., Somers, S., Opie, L. H., & Lecour, S. (2009). Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovascular Research*, *84*(2), 201–208. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvp274>
- Lambert, M. R., Johnson, J. D., Lamka, K. G., Brierley, G. P., & Altschuld, R. A. (1986). Intracellular free Ca²⁺ and the hypercontracture of adult rat heart myocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *245*(2), 426–435. [http://doi.org/10.1016/0003-9861\(86\)90234-1](http://doi.org/10.1016/0003-9861(86)90234-1)
- Latini, R. (2012) (CYCLOsporinE A in Reperfused Acute Myocardial Infarction CYCLE). *ClinicalTrials.gov* [online]. 2012 [cit. 2015-08-13]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01650662>
- Lazdunski, Frelinc, C., & Vigne, P. (1985). The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: Its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *17*(11), 1029–1042. [http://doi.org/10.1016/S0022-2828\(85\)80119-X](http://doi.org/10.1016/S0022-2828(85)80119-X)
- Le Quoc, D., Le Quoc, K., & Gaudemer, Y. (1976). Energy-dependent variation of thiol groups reactivity or accessibility in rat liver mitochondria, revealed by measurements of labelled thiol reagents incorporation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *68*(1), 106–113. [http://doi.org/10.1016/0006-291X\(76\)90016-4](http://doi.org/10.1016/0006-291X(76)90016-4)
- Lehninger, A. L. (1962). Water Uptake and Extrusion by Mitochondria in Relation to Oxidative Phosphorylation. *Physiol Rev*, *42*(3), 467–517. Retrieved from <http://physrev.physiology.org/content/42/3/467>
- Lenartowicz, E., Bernardi, P., & Azzone, G. F. (1991). Phenylarsine oxide induces the cyclosporin A-sensitive membrane permeability transition in rat liver mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *23*(4), 679–688. <http://doi.org/10.1007/BF00785817>
- Leung, A. W. C., Varanyuwatana, P., & Halestrap, A. P. (2008). The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(39), 26312–26323. <http://doi.org/10.1074/jbc.M805235200>
- Lim, K. H. H., Halestrap, A. P., Angelini, G. D., & Suleiman, M.-S. (2005). Propofol is cardioprotective in a clinically relevant model of normothermic blood cardioplegic arrest and cardiopulmonary bypass. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *230*(6), 413–20. Retrieved from http://www.researchgate.net/publication/7785619_Propofol_is_cardioprotective_in_a_clinically_relevant_model_of_normothermic_blood_cardioplegic_arrest_and_cardiopulmonary_bypass
- Lim, S. Y., Davidson, S. M., Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M. (2007). Preconditioning and postconditioning: The essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovascular Research*, *75*(3), 530–535. <http://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.04.022>

- Liu, J., Farmer, J. D., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., & Schreiber, S. L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, 66(4), 807–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1715244>
- Lopaschuk, G., Wambolt, R., & Barr, R. (1993). An imbalance between glycolysis and glucose oxidation is a possible explanation for the detrimental effects of high levels of fatty acids during aerobic reperfusion of ischemic hearts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 264(1), 135–144. Retrieved from <http://jpet.aspetjournals.org/content/264/1/135.short>
- McCord, J. M. (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England Journal of Medicine*, 312(3), 159–63. <http://doi.org/10.1056/NEJM198501173120305>
- McStay, G. P., Clarke, S. J., & Halestrap, A. P. (2002). Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *The Biochemical Journal*, 367(Pt 2), 541–8. <http://doi.org/10.1042/BJ20011672>
- Miyamoto, S., Murphy, A. N., & Brown, J. H. (2008). Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death and Differentiation*, 15(3), 521–9. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402285>
- Morrison, R. R., Tan, X. L., Ledent, C., Mustafa, S. J., & Hofmann, P. A. (2007). Targeted deletion of A2A adenosine receptors attenuates the protective effects of myocardial postconditioning. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 293(4), H2523–9. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00612.2007>
- Murry, C. E., Jennings, R. B., & Reimer, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), 1124–1136. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.74.5.1124>
- Negoro, S., Kunisada, K., Fujio, Y., Funamoto, M., Darville, M. I., Eizirik, D. L., ... Yamauchi-Takahara, K. (2001). Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Protects Cardiomyocytes from Hypoxia/Reoxygenation-Induced Oxidative Stress Through the Upregulation of Manganese Superoxide Dismutase. *Circulation*, 104(9), 979–981. <http://doi.org/10.1161/hc3401.095947>
- Nicolli, A., Basso, E., Petronilli, V., Wenger, R. M., & Bernardi, P. (1996). Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(4), 2185–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8567677>
- Nicolli, A., Petronilli, V., & Bernardi, P. (1993). Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation. *Biochemistry*, 32(16), 4461–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7682848>
- OVIIZE, Michael. Cyclosporine and Prognosis in Acute Myocardial Infarction (MI) Patients (CIRCUS). *ClinicalTrials.gov* [online]. 2011 [cit. 2015-08-11]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01502774>
- Palmieri, F. (2004). The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 447(5), 689–709. <http://doi.org/10.1007/s00424-003-1099-7>
- Pasdois, P., Parker, J. E., & Halestrap, A. P. (2013). Extent of mitochondrial hexokinase II dissociation during ischemia correlates with mitochondrial cytochrome c release, reactive oxygen species production, and infarct size on reperfusion. *Journal of the American Heart Association*, 2(1), e005645. <http://doi.org/10.1161/JAHA.112.005645>

- Peart, J. N., Pepe, S., Reichelt, M. E., Beckett, N., See Hoe, L., Ozberk, V., ... Headrick, J. P. (2014). Dysfunctional survival-signaling and stress-intolerance in aged murine and human myocardium. *Experimental Gerontology*, *50*, 72–81. <http://doi.org/10.1016/j.exger.2013.11.015>
- Penna, C., Rastaldo, R., Mancardi, D., Raimondo, S., Cappello, S., Gattullo, D., ... Pagliaro, P. (2006). Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. *Basic Research in Cardiology*, *101*(2), 180–9. <http://doi.org/10.1007/s00395-006-0584-5>
- Pestana, C. R., Silva, C. H. T. P., Pardo-Andreu, G. L., Rodrigues, F. P., Santos, A. C., Uyemura, S. A., & Curti, C. (2009). Ca²⁺ binding to c-state of adenine nucleotide translocase (ANT)-surrounding cardiolipins enhances (ANT)-Cys(56) relative mobility: a computational-based mitochondrial permeability transition study. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1787*(3), 176–82. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.12.013>
- Piot, C., Croisille, P., Staat, P., Thibault, H., Rioufol, G., Mewton, N., ... Ovize, M. (2008). Effect of Cyclosporine on Reperfusion Injury in Acute Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine*, *359*(5), 473–481. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa071142>
- Przyklenk, K., Bauer, B., Ovize, M., Kloner, R. A., & Whittaker, P. (1993). Regional ischemic “preconditioning” protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*, *87*(3), 893–899. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.87.3.893>
- Qian, T., Herman, B., & Lemasters, J. J. (1999). The mitochondrial permeability transition mediates both necrotic and apoptotic death of hepatocytes exposed to Br-A23187. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *154*(2), 117–25. <http://doi.org/10.1006/taap.1998.8580>
- Rahman, S., Li, J., Bopassa, J. C., Umar, S., Iorga, A., Partownavid, P., & Eghbali, M. (2011). Phosphorylation of GSK-3 β mediates intralipid-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion injury. *Anesthesiology*, *115*(2), 242–53. <http://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318223b8b9>
- Reimer, K. A., Lowe, J. E., Rasmussen, M. M., & Jennings, R. B. (1977). The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*, *56*(5), 786–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/912839>
- Reimer, K. A., Murry, C. E., Yamasawa, I., Hill, M. L., & Jennings, R. B. (1986). Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *The American Journal of Physiology*, *251*(6 Pt 2), H1306–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3789183>
- Rezkalla, S. H., & Kloner, R. A. (2004). Ischemic preconditioning and preinfarction angina in the clinical arena. *Nature Clinical Practice. Cardiovascular Medicine*, *1*(2), 96–102. <http://doi.org/10.1038/ncpcardio0047>
- Seidlmayer, L. K., Blatter, L. A., Pavlov, E., & Dedkova, E. N. Inorganic polyphosphate--an unusual suspect of the mitochondrial permeability transition mystery. *Channels (Austin, Tex.)*, *6*(6), 463–7. <http://doi.org/10.4161/chan.21939>
- Schäfer, C., Ladilov, Y., Inserte, J., Schäfer, M., Haffner, S., Garcia-Dorado, D., & Piper, H. M. (2001). Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovascular Research*, *51*(2), 241–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470463>
- Siliprandi, D., Scutari, G., Zoccarato, F., & Siliprandi, N. (1974). Action of “diamide” on some energy linked processes of rat liver mitochondria. *FEBS Letters*, *42*(2), 197–199. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(74\)80784-2](http://doi.org/10.1016/0014-5793(74)80784-2)
- Skulachev, V. P. (1991). Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Letters*, *294*(3), 158–162. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80658-P](http://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80658-P)

- Szabó, I., Pinto, V. De, & Zoratti, M. (1993). The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. *FEBS Letters*, 330(2), 206–210. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80274-X](http://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80274-X)
- Sztark, F., Ichas, F., Ouhabi, R., Dabadie, P., & Mazat, J.-P. (1995). Effects of the anaesthetic propofol on the calcium-induced permeability transition of rat heart mitochondria: direct pore inhibition and shift of the gating potential. *FEBS Letters*, 368(1), 101–104. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00610-L](http://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00610-L)
- Tong, H., Imahashi, K., Steenbergen, C., & Murphy, E. (2002). Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase--dependent pathway is cardioprotective. *Circulation Research*, 90(4), 377–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884365>
- Vandenberg, J. I., Metcalfe, J. C., & Grace, A. A. (1993). Mechanisms of pHi recovery after global ischemia in the perfused heart. *Circulation Research*, 72(5), 993–1003. <http://doi.org/10.1161/01.RES.72.5.993>
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., ... Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5517), 727–30. <http://doi.org/10.1126/science.1059108>
- Voet, Donald a Judith G. Voet. *Biochemistry, 3rd edition*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2004. ISBN 0-471-19250-X
- .Wu, N., Zhang, X., Guan, Y., Shu, W., Jia, P., & Jia, D. (2014). Hypercholesterolemia abrogates the cardioprotection of ischemic preconditioning in isolated rat heart: roles of glycogen synthase kinase-3 β and the mitochondrial permeability transition pore. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 69(1), 123–30. <http://doi.org/10.1007/s12013-013-9778-2>
- Yadav, H. N., Singh, M., & Sharma, P. L. (2010). Modulation of the cardioprotective effect of ischemic preconditioning in hyperlipidaemic rat heart. *European Journal of Pharmacology*, 643(1), 78–83. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.06.015>
- Yamashita, N., Hoshida, S., Otsu, K., Taniguchi, N., Kuzuya, T., & Hori, M. (2000). Involvement of cytokines in the mechanism of whole-body hyperthermia-induced cardioprotection. *Circulation*, 102(4), 452–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10908219>
- Yellon, D. M., Alkhulaifi, A. M., & Pugsley, W. B. (1993). Preconditioning the human myocardium. *Lancet (London, England)*, 342(8866), 276–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8101304>
- Zatta, A. J., Kin, H., Yoshishige, D., Jiang, R., Wang, N., Reeves, J. G., ... Vinten-Johansen, J. (2008). Evidence that cardioprotection by postconditioning involves preservation of myocardial opioid content and selective opioid receptor activation. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 294(3), H1444–51. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.01279.2006>
- Zhao, H., Sapolsky, R. M., & Steinberg, G. K. (2006). Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 26(9), 1114–21. <http://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600348>